

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-9269

(43) 公開日 平成11年(1999) 1月19日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00	E
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 Q 1/02	
1/68		1/68	A
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	Y

審査請求 未請求 請求項の数12 F D (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願平9-180540

(22) 出願日 平成9年(1997) 6月19日

(71) 出願人 000124269

科研製薬株式会社

東京都文京区本駒込2丁目28番8号

(72) 発明者 鶴飼 太郎

京都府京都市山科区四ノ宮南河原町14 科  
研製薬株式会社総合研究所内

(72) 発明者 野木森 克己

京都府京都市山科区四ノ宮南河原町14 科  
研製薬株式会社総合研究所内

(72) 発明者 田村 誠

京都府京都市山科区四ノ宮南河原町14 科  
研製薬株式会社総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 清水 初志

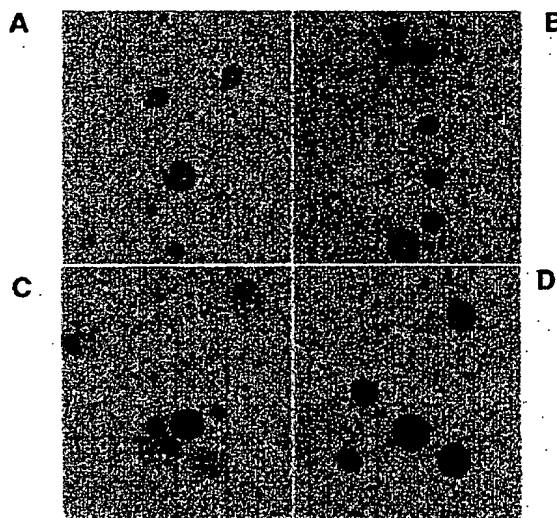
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 破骨細胞系細胞

(57) 【要約】

【課題】 新規な破骨細胞前駆細胞、並びに該破骨細胞前駆細胞を用いた破骨細胞系細胞に対する分化促進因子の検出法およびスクリーニング法を提供することを課題とする。

【解決手段】 マウス骨髓細胞をM-CSFの存在下でマウス頭蓋骨由来のストローマ細胞と共存培養することにより、新規な破骨細胞前駆細胞を調製することに成功した。調製した高純度の破骨細胞前駆細胞を用いることにより、破骨細胞系細胞に対する分化促進因子を検出し、スクリーニングすることが可能であることを見いだした。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 M-CSF及び頭蓋骨由来のストローマ細胞の存在下で、造血前駆細胞を培養することを特徴とする、カルシトニン受容体陰性、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ陰性の破骨細胞前駆細胞の調製方法。

【請求項2】 M-CSF及び頭蓋骨由来のストローマ細胞の存在下で、造血前駆細胞を培養することにより得ることができる、カルシトニン受容体陰性、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ陰性の破骨細胞前駆細胞。

【請求項3】 骨吸収因子の存在下で、48時間以内に前破骨細胞に分化することができる、破骨細胞前駆細胞。

【請求項4】 骨吸収因子が $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、副甲状腺ホルモン、またはプロスタグランジンE2である、請求項3の破骨細胞前駆細胞。

【請求項5】 細胞表面マーカーが、Gr-1陽性、Mac-1陽性、Mac-2陽性、F4/80陰性である、請求項2～4のいずれかに記載の破骨細胞前駆細胞。

【請求項6】 造血前駆細胞から請求項2もしくは3に記載の破骨細胞前駆細胞への分化、請求項2もしくは3に記載の破骨細胞前駆細胞から前破骨細胞への分化、または造血前駆細胞から前破骨細胞への分化を、被験蛋白質及びM-CSFの存在下で観察する工程を含む、破骨細胞系細胞に対する分化促進因子の検出方法。

【請求項7】 造血前駆細胞から請求項2もしくは3に記載の破骨細胞前駆細胞への分化、請求項2もしくは3に記載の破骨細胞前駆細胞から前破骨細胞への分化、または造血前駆細胞から前破骨細胞への分化を、被験蛋白質及びM-CSFの存在下で観察し、分化能を有する蛋白質を選択する工程を含む、破骨細胞系細胞に対する分化促進因子のスクリーニング方法。

【請求項8】 造血前駆細胞から請求項2もしくは3に記載の破骨細胞前駆細胞への分化、請求項2もしくは3に記載の破骨細胞前駆細胞から前破骨細胞への分化、または造血前駆細胞から前破骨細胞への分化を、被験遺伝子が発現可能に導入された細胞およびM-CSFの存在下で観察する工程を含む、破骨細胞系細胞に対する分化促進因子をコードする遺伝子の検出方法。

【請求項9】 造血前駆細胞から請求項2もしくは3に記載の破骨細胞前駆細胞への分化、請求項2もしくは3に記載の破骨細胞前駆細胞から前破骨細胞への分化、または造血前駆細胞から前破骨細胞への分化を、被験遺伝子が発現可能に導入された細胞およびM-CSFの存在下で観察し、分化能を有する遺伝子を選択する工程を含む、破骨細胞系細胞に対する分化促進因子をコードする遺伝子のスクリーニング方法。

【請求項10】 M-CSF遺伝子を発現するベクターを導入した細胞と分化を観察する細胞とを共存培養することにより、M-CSF遺伝子を発現するベクターを導入し

た細胞から分化を観察する細胞にM-CSFを供給することを特徴とする、請求項6～9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】 請求項7の方法によって選択された、破骨細胞系細胞に対する分化促進因子。

【請求項12】 請求項9の方法によって選択された、破骨細胞系細胞に対する分化促進因子をコードする遺伝子。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規な破骨細胞前駆細胞、および該細胞を用いた破骨細胞系細胞の分化促進因子の検出方法およびスクリーニング方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】マウス骨髄細胞はマウス骨髄由来のストローマ細胞上で造血発生し、リンパ球系細胞、顆粒球系細胞、赤芽球等の細胞を試験管内で形成させることが可能である。その際、分化誘導するそれぞれの細胞系譜により添加するサイトカインや造血因子は異なるが、基本的にストローマ細胞の造血支持活性が必要である。一方、マウスにおける破骨細胞形成は、マウス頭蓋骨由来のストローマ細胞、または、マウス骨髄由来のストローマ細胞とマウス骨髄細胞を骨吸収因子 ( $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、副甲状腺ホルモン、プロスタグランジンE2、IL-6やIL-11などのgp130を介したシグナルを伝達するサイトカイン)の存在下で共存培養すると試験管内で観察できる。しかし、破骨細胞が形成される過程は未だ殆ど解明されておらず、また、破骨細胞に分化する前駆細胞の細胞系譜に関しては様々な論争がある。

【0003】宇田川らは、肺泡マクロファージが非常に高い確率でストローマ細胞との共存培養により破骨細胞に分化することを示し、マクロファージが破骨細胞の前駆細胞であることを主張したが、この細胞は破骨細胞に分化するのに10日間を要し、破骨細胞に分化す能力を保持しているが、生理的な破骨細胞前駆細胞であるとは考えがたい(N. Udagawa et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7260-7264 (1990)、N. Takahashi et al. J. B. M. R 6, 977-985 (1991))。Chambersらは、破骨細胞前駆細胞はCFU-MOというマクロファージと破骨細胞に分化するメチルセルロース中でのコロニー形成細胞の存在を仮定しているが、この細胞は増殖期にあり、プロジェニター(増殖能を保持した前駆細胞)である可能性は高いが、増殖を介さずに分化する破骨細胞前駆細胞とは異なると考えられる(G. Hattersley et al. Endocrinology 128, 259-262 (1991)、S. Tanaka et al. J. Clin. Invest 91, 257-263 (1993)、T. J. Chambers et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5578-5582 (1993))。高橋らは、共存培養において破骨細胞前駆細胞の存在を示唆する実験を行っているが、直接の証明はされておらず、共存培養系からの破骨

細胞前駆細胞の純化に関する記載も無い(N. Takahashi et al. Developmental Biology 163, 212-221 (1994))。さらに藤川らは、ヒトの末梢単核細胞をヒト型のM-CSF存在下でマウス由来のストローマ細胞と共存培養すると、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の添加により破骨細胞が誘導される事を示した(S. Hayashi et al. J. Cell. Physiol 170, 241-247 (1997))。また最近、西川らは、骨髓細胞内の造血系細胞をフローサイトメトリーによりソーティングし、c-kit 陽性、c-fms 陰性の細胞が破骨細胞前駆細胞を多く含む画分であることを証明したが、この細胞群の破骨細胞への分化には6日間のストローマ細胞との共存培養を要し、これもやはりプロジェクトであると考えられる(Y. Fujikawa et al. Endocrinology 137, 4058-4060 (1996))。このように、これまでに共存培養系において短時間で破骨細胞へ分化しうる破骨細胞前駆細胞を単離した報告例は皆無である。

#### 【0004】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明は、新規な破骨細胞前駆細胞を提供することを課題とする。さらに、本発明は、該破骨細胞前駆細胞を用いた破骨細胞系細胞に対する分化促進因子の検出法およびスクリーニング法を提供することを課題とする。

#### 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、マウス骨髓細胞をM-CSFの存在下でマウス頭蓋骨由来のストローマ細胞と共存培養することにより、新規な破骨細胞前駆細胞を調製することに成功した。さらに、本発明者らは、調製した高純度の破骨細胞前駆細胞を用いることにより、破骨細胞系細胞に対する分化促進因子を検出し、スクリーニングすることが可能であることを見いだした。

【0006】即ち、本発明は、(1) M-CSF及び頭蓋骨由来のストローマ細胞の存在下で、造血前駆細胞を培養することを特徴とする、カルシトニン受容体陰性、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ陰性の破骨細胞前駆細胞の調製方法、(2) M-CSF及び頭蓋骨由来のストローマ細胞の存在下で、造血前駆細胞を培養することにより得ることができる、カルシトニン受容体陰性、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ陰性の破骨細胞前駆細胞、(3) 骨吸収因子の存在下で、48時間以内に前破骨細胞に分化することができる、破骨細胞前駆細胞、(4) 骨吸収因子が $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、副甲状腺ホルモン、またはプロスタグランジンE2である、(3)の破骨細胞前駆細胞、(5) 細胞表面マーカーが、Gr-1陽性、Mac-1陽性、Mac-2陽性、F4/80陰性である、(2)～(4)のいずれかに記載の破骨細胞前駆細胞、(6) 造血前駆細胞から(2)もしくは(3)に記載の破骨細胞前駆細胞への分化、(2)もしくは(3)に記載の破骨細胞前駆細胞か

ら前破骨細胞への分化、または造血前駆細胞から前破骨細胞への分化を、被験蛋白質及びM-CSFの存在下で観察する工程を含む、破骨細胞系細胞に対する分化促進因子の検出方法、(7) 造血前駆細胞から(2)もしくは(3)に記載の破骨細胞前駆細胞への分化、(2)もしくは(3)に記載の破骨細胞前駆細胞から前破骨細胞への分化、または造血前駆細胞から前破骨細胞への分化を、被験蛋白質及びM-CSFの存在下で観察し、分化能を有する蛋白質を選択する工程を含む、破骨細胞系細胞に対する分化促進因子のスクリーニング方法、

(8) 造血前駆細胞から(2)もしくは(3)に記載の破骨細胞前駆細胞への分化、(2)もしくは(3)に記載の破骨細胞前駆細胞から前破骨細胞への分化、または造血前駆細胞から前破骨細胞への分化を、被験遺伝子が発現可能に導入された細胞およびM-CSFの存在下で観察する工程を含む、破骨細胞系細胞に対する分化促進因子をコードする遺伝子の検出方法、(9) 造血前駆細胞から(2)もしくは(3)に記載の破骨細胞前駆細胞への分化、(2)もしくは(3)に記載の破骨細胞前駆細胞から前破骨細胞への分化、または造血前駆細胞から前破骨細胞への分化を、被験遺伝子が発現可能に導入された細胞およびM-CSFの存在下で観察し、分化能を有する遺伝子を選択する工程を含む、破骨細胞系細胞に対する分化促進因子をコードする遺伝子のスクリーニング方法、(10) M-CSF遺伝子を発現するベクターを導入した細胞と分化を観察する細胞とを共培養することにより、M-CSF遺伝子を発現するベクターを導入した細胞から分化を観察する細胞にM-CSFを供給することを特徴とする、(6)～(9)のいずれかに記載の方法、(11) (7)の方法によって選択された、破骨細胞系細胞に対する分化促進因子、(12)

(9)の方法によって選択された、破骨細胞系細胞に対する分化促進因子をコードする遺伝子、に関する。

【0007】なお、本発明において「造血前駆細胞」とは、多能性幹細胞または造血幹細胞から発生する細胞で、主として顆粒球-マクロファージ系の細胞に分化する細胞を指す。本発明において「ストローマ細胞」とは、様々な分化系譜の未分化な前駆細胞の増殖や分化を指示する活性を有する細胞を指す。また、本発明において「骨吸収因子」とは、生体内で血中カルシウムイオン濃度を維持するために働く局所因子、ホルモン、サイトカインなどを指す。本発明において「前破骨細胞」とは、単独で骨吸収活性を有する細胞であって、カルシトニン受容体陽性、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ陽性の細胞を指す。さらに、本発明において「破骨細胞系細胞」とは、破骨細胞に分化する細胞、または破骨細胞を指す。

#### 【0008】

【発明の実施の形態】本発明の破骨細胞前駆細胞(Mouse Calvarial cells Initiating Osteoclast Precursors

；MC-IOPs)は、造血前駆細胞由来マクロファージや骨髄細胞に含まれる造血系細胞とも分化段階が異なる細胞群であり、ストローマ細胞との共存培養系で極めて短時間内に破骨細胞の形質を有する細胞(酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ(以下、単に「TRAP」と称する)陽性細胞)に分化する。破骨細胞への分化過程においてこのような細胞の存在は報告されておらず、本発明者等により初めて見いだされた細胞である。本発明の破骨細胞前駆細胞は具体的には、以下のような特性を有する。

【0009】即ち、まず、カルシトニン受容体陰性、TRAP陰性の特徴を有し、骨吸収因子の存在下で、48時間以内にカルシトニン受容体陽性、TRAP陽性である前破骨細胞(Experimental Cell Research (1995) 219,p679-686)に分化することができる。また、細胞表面マーカーが、Gr-1陽性、Mac-1陽性、Mac-2陽性、F4/80陰性であるという特徴を有し、細胞表面マーカーが、Gr-1陰性、Mac-1陰性、Mac-2陽性、F4/80陰性である前破骨細胞と相違する。なお、カルシトニン受容体の存在は、例えば、<sup>125</sup>I-カルシトニンを用いたオートラジオグラフィーにより検出することが可能であり、TRAPの存在は、実施例2(3)に記載のTRAP染色液による染色により検出することが可能である。また、細胞表面マーカーは、FACScliverを用いたフローサイトメトリーにより検出することが可能である。

【0010】また、本発明の破骨細胞前駆細胞は、M-CSF及び頭蓋骨由来のストローマ細胞の存在下で、造血前駆細胞を培養することにより調製することが可能である。「M-CSF及び頭蓋骨由来のストローマ細胞の存在下」とは何らかの形で両者が存在すれば足り、例えば、M-CSFを産生する頭蓋骨由来のストローマ細胞の存在下である。但し、M-CSFを産生しない頭蓋骨由来のストローマ細胞、例えば、OP/OPマウス(M-CSF欠損変異マウス)の頭蓋骨由来のストローマ細胞を用いる場合には、別途M-CSFを添加する。用いるストローマ細胞量は、通常、サブコンフルエントになる程度である。なお、用いる頭蓋骨由来のストローマ細胞としては、初代培養より調製した頭蓋骨細胞が好ましい。頭蓋骨由来のストローマ細胞の調製は、例えば、実施例1に記載の方法に従って行うことが可能である。

【0011】頭蓋骨由来のストローマ細胞と造血前駆細胞との共存培養は、例えば、牛胎児血清を含むα-MEM培地にて、5% CO<sub>2</sub>、37℃、湿度100%の条件で行い、形成される破骨細胞前駆細胞は、共存培養後3〜7日目に採取する。なお、高純度の破骨細胞前駆細胞を調製するためには、例えば、培養後の細胞群に対しSephadex G-10などを用いると好ましい。

【0012】また、本発明の破骨細胞前駆細胞を、M-CSF及び骨吸収因子で処理した頭蓋骨由来のストローマ細胞の存在下で培養することにより、前破骨細胞を調製することが可能である。前破骨細胞の調製に用いるM-CSF

は、上記した本発明の破骨細胞前駆細胞の調製と同様、頭蓋骨細胞により生産されていてもよく、また別途添加してもよい。

【0013】頭蓋骨由来のストローマ細胞は、破骨細胞への分化を促進する因子を発現させるために、骨吸収因子による処理を行う。用いられる骨吸収因子としては、破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化を促進する因子を頭蓋骨細胞に発現させるものであれば特に制限はないが、例えば、1α, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、副甲状腺ホルモン、プロスタグランジンE<sub>2</sub>、インターロイキン1、インターロイキン6+可溶性インターロイキン6受容体などが好ましく、特に1α, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>が好ましい。頭蓋骨細胞の処理に用いる骨吸収因子量は、骨吸収因子の種類により変動しうが、例えば、骨吸収因子として1α, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>や副甲状腺ホルモンを用いる場合には、通常、10<sup>-8</sup>M〜10<sup>-7</sup>M程度、骨吸収因子としてプロスタグランジンE<sub>2</sub>を用いる場合には、通常10<sup>-7</sup>〜10<sup>-6</sup>程度である。破骨細胞前駆細胞との共存培養に用いる頭蓋骨細胞量は、通常、サブコンフルエントになる程度である。用いる頭蓋骨細胞としては、上記した本発明の破骨細胞前駆細胞の調製方法と同様に初代培養より調製した頭蓋骨細胞が好ましい。

【0014】本発明の破骨細胞前駆細胞とストローマ細胞との共存培養は、例えば、牛胎児血清を含むα-MEM培地にて、5% CO<sub>2</sub>、37℃、湿度100%の条件で行う。この共存培養により、本発明の破骨細胞前駆細胞を、48時間以内に前破骨細胞(TRAP陽性細胞)へ分化させることができる。

【0015】本発明の応用として、上記の破骨細胞への分化系を用いた、破骨細胞系細胞に対する分化促進因子の検出およびスクリーニングが考えられる。

【0016】上記破骨細胞への分化系における造血前駆細胞から本発明の破骨細胞前駆細胞への分化、および本発明の破骨細胞前駆細胞から前破骨細胞への分化には、M-CSFの存在以外にストローマ細胞との共存培養を要するため、該ストローマ細胞は破骨細胞系細胞に対する分化促進因子を発現しているといえる。従って、M-CSFと被検タンパク質の存在下で造血前駆細胞を培養し、造血前駆細胞の本発明の破骨細胞前駆細胞への分化を観察することにより、被検タンパク質が造血前駆細胞から本発明の破骨細胞前駆細胞への分化の促進因子であるか否かを検出することが可能である。同様に、M-CSFと被検タンパク質の存在下で本発明の破骨細胞前駆細胞を培養し、本発明の破骨細胞前駆細胞から前破骨細胞への分化を観察することにより、被検タンパク質が本発明の破骨細胞前駆細胞から前破骨細胞への分化の促進因子であるか否かを検出することが可能である。さらには、M-CSFと被検タンパク質の存在下で造血前駆細胞を培養し、造血前駆細胞から前破骨細胞への分化を観察することにより、被検タンパク質が造血前駆細胞から前破骨細胞への分化の促進因子であるか否かを検出することが可能である。

本発明の破骨細胞前駆細胞や前破骨細胞への分化は、TRAP染色後、顕微鏡下で観察することにより検出することが可能である。また、被検タンパク質の中から分化能が検出された蛋白質を選択することにより、破骨細胞系細胞に対する分化促進因子をスクリーニングすることも可能である。

【0017】一方、造血前駆細胞から本発明の破骨細胞前駆細胞への分化、本発明の破骨細胞前駆細胞から前破骨細胞への分化または造血前駆細胞から前破骨細胞への分化を、被検遺伝子が発現可能に導入された細胞およびM-CSFの存在下で観察することにより、被検遺伝子が破骨細胞系細胞に対する分化促進因子をコードするか否かを検出することも可能である。

【0018】被検遺伝子を導入する細胞としては、例えば、COS-7細胞、CHO細胞、MOP細胞、COP細胞、繊維芽細胞、上皮細胞、ES細胞、間葉系細胞などが挙げられる。被検遺伝子は、適当なベクターに組み込んで細胞へ導入することも可能である。好適なベクターとしては、例えば、pAP3neo (TAKARA社製)、pCDNA3.1 (Invitrogen社製)、pCDM8 (Invitrogen社製)、pCD (ATCC 53149)、pMX (ATCC 67092) などが挙げられる。細胞への被検遺伝子の導入は、当業者に公知の方法、例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、レトロウイルスやアデノウイルスによる感染法、マイクロインジェクション法などにより行うことが可能である。

【0019】また、例えば、遺伝子のライブラリーを用い、分化能を有する遺伝子を選択することにより、破骨細胞系細胞に対する分化促進因子をコードする遺伝子をスクリーニングすることも可能である。遺伝子ライブラリーは、例えば、リンカープライマー法 (実験医学別冊バイオマニュアルシリーズ 2. p79-94) に従い、 $1\alpha$ , 25(OH) $_2$ D $_3$ で処理した頭蓋骨由来のストローマ細胞から調製することが可能である。また、骨芽細胞系のストローマ細胞を用いることも可能である。遺伝子ライブラリーから目的の遺伝子をスクリーニングする方法としては、例えば、COS-7細胞に上記ライブラリーを導入して発現クローニングする方法 (Sibling法: 実験医学別冊バイオマニュアルシリーズ 3. p118-130) が挙げられる。

【0020】上記の検出またはスクリーニングに用いられるM-CSFは、直接培養液に添加されていてもよく、またM-CSF遺伝子を発現するベクターを導入した細胞を共培養することにより供給されてもよい。M-CSFを発現させるための細胞としては、例えば、L929細胞やCOS細胞を好適に用いることができる。該細胞へ導入する、M-CSF遺伝子を発現させるためのベクターとしては、例えば、M-CSF遺伝子が挿入されているpCCSF-17 (ATCC 53149, Science 230:291-296(1985)) やp3ACSF-69 (ATCC 67092, Science 235:1504-1508(1987)) を用いることが可能である、また、例えば、pCDNA3.1Zeo (Invitrogen社

製) にM-CSF遺伝子を挿入して用いることも可能である。

【0021】スクリーニングされた、破骨細胞系細胞に対する分化促進因子またはその遺伝子は、例えば、骨粗鬆症などの骨量減少症の改善、リウマチや変形性関節症などの骨代謝異常症などの改善、大理石病などの骨量増加症の改善、多発性骨髄腫や癌の骨転移などの骨代謝異常疾患の治療および改善などに用いることが考えられ、またこれらの疾患の免疫学的診断を確立するための抗原の探索に利用することも考えられる。

【0022】

【実施例】

【実施例1】

(1) マウス頭蓋骨由来のストローマ細胞(Mouse Calvarial cells; 以下、単に「MCs」と称する)の調製

A) ddyマウス哺乳1日齢を5腹分をと殺し、70%アルコールに浸けて滅菌した。前頭骨と頭頂骨を採取した後、a-MEM培地 (大日本製薬社) により1回洗浄した。酵素液 (0.1%コラゲナーゼ (和光純薬社)、0.2%ディスパーゼ (合同酒精社)) を含むa-MEM培地 10ml を加えて37°Cで5分間振とうした後、1000xgで遠心して上清を廃棄した。さらに、ペレットに酵素液10mlを加えて37°Cで10分間振とうし、細胞浮遊液を回収した。この操作をさらに3回繰り返して細胞を回収した。細胞をa-MEMで1回洗った後、10%の牛胎児血清 (JRH バイオサイエンス社) を含むa-MEM培地に懸濁させ、10cmのカルチャーディッシュ (コーニング社) 5枚に播種して 5% CO $_2$ 、37°C、湿度100%にて培養した。サブコンフルエントになったところでトリプシン-EDTA (ギブコBRL社) 処理により細胞を回収し、ディッシュ1枚からディッシュ5枚に継代した。さらに、サブコンフルエントになったところで細胞を回収し、 $1 \times 10^6$  cells/mlにセルバンカー (ダイアトロン社) に調製した後、1mlずつ凍結用チューブ (ファルコン社) に入れて-80°Cで凍結保存した。

【0023】B) OP/OPマウス哺乳1日齢をと殺し、70%アルコールに浸けて滅菌した。前頭骨と頭頂骨を採取した後、a-MEM培地により1回洗浄し、ナイフを用いてミンスした。骨片をセルバンカーに浮遊させた後、-80°Cで凍結保存した。

【0024】(2) マウス骨髄細胞(Mouse Bone Marrow cells; 以下、単に「BMs」と称する)の調製  
ddyマウス (6から8週齢、雄 (清水実験材料社)) から脛骨をクリーンベンチ内で無菌的に採取し、ペニシリン注射針を用いてa-MEM培地で押し出して調製した。なお、調製した骨髄細胞中には、造血前駆細胞が含まれ、この細胞が本発明の破骨細胞前駆細胞(Mouse Calvarial cells Initiating Osteoclast Precursors; 以下、単に「MC-IOPs」と称する)に分化しうる。

【0025】(3) 共存培養

10cmのカルチャーディッシュに、(1)で調製した「MC

s」 $1 \times 10^6$  cells と、(2)で調製した脛骨2本分の「BMs」を10%の牛胎児血清を含む a-MEM培地10mlに懸濁させて播種し、5%  $\text{CO}_2$ 、37°C、湿度100%にて培養した。培養後2日目と5日目に培地を全量廃棄し、10%の牛胎児血清を含むa-MEM培地10mlを加えて7日間培養した。

#### 【0026】(4)「MC-IOPs」の調製

(3)で生成した全細胞をセルスクレイパー(ヌンク社)を用いて回収し、先端の口径が大きなガラスピペットを用いて細胞を十分にピペッティングした。さらに、40 $\mu\text{m}$ のメッシュ(ファルコン社)に通し、1000xgで遠心した後上清を廃棄し、ペレットをカルチャーディッシュ1枚から回収された細胞に対して10%の牛胎児血清を含む a-MEM培地 1ml を用いて懸濁した。次に、上記方法により調製した細胞懸濁液 1ml を、Sephadex G-10 カラム(PBSで十分に洗浄した後 PBSに対して60%のスラリーとして懸濁し、110°C、20分間オートクレーブして滅菌したSephadex G-10 担体(ファルマシア社) 2ml を、0.7 cm x 5 cm のエコノカラム(バイオラッド社)に充填した後、10%の牛胎児血清を含むa-MEM培地 5 ml により平衡化した)に添加した。細胞懸濁液が担体の上部まで浸潤した後、10%の牛胎児血清を含むa-MEM培地 5 ml により洗浄し、素通り細胞を回収した。1000 x gで5分間遠心した後上清を廃棄し、10%の牛胎児血清を含むa-MEM培地に懸濁して「MC-IOPs」として実験に供した。

#### 【0027】【実施例2】

(1)「MCs」と「BMs」の共存培養における、「MC-IOPs」生成過程の観察

実施例1(3)の方法により生成した造血系細胞を、培養後2日目、4日目、7日目にそれぞれセルスクレイパーを用いて回収し、先端の口径が大きなガラスピペットを用いて細胞を十分にピペッティングした。さらに、40 $\mu\text{m}$ のメッシュに通し、1000xgで遠心した後上清を廃棄し、PBSに懸濁した。7日目の細胞は、さらに実施例1(4)の方法に従い調製した。回収した細胞をPBSを用いて  $1 \times 10^5$  cells/ml に調製し、その 1ml をサイトスピンを用いて500回転、1分間遠心してスライドガラス(マツナミ社)に固定した。室温で風乾した後、Wright-Giemsa染色液(シグマ社) 1ml をスライドガラスに添加し、30秒間静置した。染色液を廃棄した後、イオン交換水 1ml を添加してさらに 5分間静置した。スライドガラスを細\*

\* 胞が剥がれないように水道水で洗浄した後、風乾して検鏡に供した。

【0028】この結果、培養2日目と4日目には顆粒球系の細胞が多く観察されたが、7日目にはマクロファージ系の細胞が多く観察された。また、Sephadex G-10カラムを通すことによりマクロファージ系の細胞が除かれるのが観察された(図1)。なお、図中(A)は共培養後3日目の細胞、(B)は5日目の細胞、(C)は7日目の細胞、(D)はSephadex G-10カラムにて精製した7日目の細胞(MC-IOPs)である。

【0029】(2)「MC-IOPs」のメチルセルロース中でのコロニー形成能の解析

実施例1(4)の方法に従い調製した「MC-IOPs」と、「MCs」の代わりにST2細胞株(造血支持能があり、in vitroで造血前駆細胞を維持できる)とOP9細胞株(ST2細胞と同様の活性を有するが、M-CSFを産生しないためにマクロファージ系の細胞は生成されない)を用いて実施例1(4)の方法に従い調製した造血系細胞、さらに実施例1(2)の方法により調製した骨髓細胞を、 $1 \times 10^5$  cells/ml となるようにa-MEM培地に懸濁した。次に、2.2%メチルセルロース(メチルセルロース4000Cp(和光純薬社) 11g と蒸留水 250 ml をそれぞれ120°C、20分間オートクレーブした後混合し、ホットプレート上で1時間攪拌した。37°Cまで冷却した後、37°Cに保温しておいた  $2 \times \text{a-MEM培地 } 250 \text{ ml}$  を混合し、室温で1時間攪拌した。次に、氷冷しながら1時間混合して調製した) 4 ml、a-MEM培地 3 ml、牛胎児血清 1 ml、 $5 \times 10^{-2} \text{ M } 2\text{-merc}$  aptoethanol 20 $\mu\text{l}$ 、細胞懸濁液 2 ml を混合した後、ボルテックスミキサーを用いて十分に懸濁した。細胞懸濁液を10mlのディスポーザブルシリンジと18Gの注射針を用いて採取した後、12穴のカルチャープレート(コーニング社)に 2ml ずつ添加した。各種サイトカインに対する反応性は、PBSに対して1 $\mu\text{g/ml}$ に調製した rmG-CSF (R&D社)を 10 $\mu\text{l}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ に調製した rmGM-CSF (R&D社) 10 $\mu\text{l}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ に調製した rhM-CSF (森永乳業社) 10 $\mu\text{l}$ をそれぞれ添加して、5%  $\text{CO}_2$ 、37°C、湿度100%にて 6日間培養した。各種支持細胞により支持された造血系細胞のコロニー形成能を表1に示す。

#### 【0030】

【表1】

細胞	コロニーの型		
	CFU-G	CFU-GM	CFU-M
ST2細胞株	13.7 $\pm$ 2.1	57.3 $\pm$ 7.8	62.0 $\pm$ 3.0
OP9細胞株	21.0 $\pm$ 2.0	122.0 $\pm$ 7.6	106.7 $\pm$ 4.5
MC-IOPs	4.7 $\pm$ 2.1	13.0 $\pm$ 2.7	8.7 $\pm$ 1.5

11

ST2細胞株とOP9細胞株により支持された造血細胞は、各種CSFによりコロニーを形成する造血前駆細胞が維持されていたが、「MCs」により支持された「MC-IOPs」は、いずれのCSFによってもコロニーを形成しなかった。このことから「MCs」により支持された「MC-IOPs」が増殖能を失っていることが判明した。

【0031】(3) 「MC-IOPs」の分化過程の解析：

「MCs」を用いたアッセイ法

A) 実施例1(1)の方法により調製した「MCs」を  $4 \times 10^4$  cells ずつ  $400 \mu\text{l}$  の10%の牛胎児血清を含む a-MEM培地に懸濁した後、48ウェルカルチャープレート（コーニング社）に播種し、5%  $\text{CO}_2$ 、37°C、湿度100%にて2日間培養した。培地を廃棄した後、実施例1(4)の方法に従い調製した「MC-IOPs」  $2 \times 10^3$  cellsを  $400 \mu\text{l}$  の10%の牛胎児血清を含む a-MEM培地に懸濁して播種し、 $1 \times 10^{-7}$  M の  $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  を  $4 \mu\text{l}$  ずつ添加して、5%  $\text{CO}_2$ 、37°C、湿度100%にて培養した。経時的に培地を廃棄した後、10%ホルマリン（和光純薬社）/PBS溶液にて室温で5分間固定し、さらにエタノール/アセトン（1:1）溶液にて室温で1分間固定した。風乾後、酸性フォスファターゼ染色液（Naphthol AS-MX phosphate（シグマ社）5 mg を N,N-dimethyl formamide（和光純薬社）100  $\mu\text{l}$  に溶解した後、Fast red violet LB salt（シグマ社）30 mg を添加してTRAP緩衝液（0.1M Acetate buffer(pH5.0)、50mM Sodium Tartrate（和光純薬））50 ml で溶解したもの）を用いて細胞を染色し、水道水で洗浄して検鏡に供した。この結果、「MC-IOPs」（図中の黒丸）は、24時間目からTRAP陽性細胞（前破骨細胞）に分化するのが観察され、48時間までTRAP陽性細胞数は増加した。また、「BMs」（図中の白丸）は、培養72時間後からTRAP陽性細胞に分化するのが観察された（図2A）。

【0032】B) A)の方法により調製した48ウェルカルチャープレートの各ウェルに、実施例1(4)の方法に従い調製した「MC-IOPs」を  $1 \times 10^2$  cells から  $1 \times 10^4$  cells まで細胞数を変えて  $400 \mu\text{l}$  の10%の牛胎児血清を含む a-MEM培地に懸濁して播種した後、 $1 \times 10^{-7}$  M の  $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  を  $4 \mu\text{l}$  ずつ添加して、5%  $\text{CO}_2$ 、37°C、湿度100%にて48時間培養した。培養終了後、実施例2(3)A)の方法に従いTRAP染色を施した後、検鏡に供した。この結果、「MC-IOPs」（図中の黒丸）は、はん種した細胞数に比例してTRAP陽性細胞に分化した（図2B）。

【0033】(4) 「MC-IOPs」の細胞系譜の解析  
造血前駆細胞由来のマクロファージは、実施例1(2)の方法により調製した骨髓細胞から実施例2(2)の方法に従いメチルセルロース中で rhCSF-1 により生成させたマクロファージコロニーを、先端の口径が大きなガラスピペットを用いて細胞を十分にピペッティングして細胞を回収し、a-MEM培地で1回洗浄した細胞を用いた。実施例1(4)の方法に従い調製した「MC-IOPs」と、実施例1(2)の方法により調製した骨髓細胞、さらに造血前駆

12

細胞由来のマクロファージをそれぞれ  $2 \times 10^3$  cells ずつ  $400 \mu\text{l}$  の10%の牛胎児血清を含む a-MEM培地に懸濁し、実施例2(3)A)の方法により調製したカルチャープレートに播種した後、 $1 \times 10^{-7}$  M の  $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  を  $4 \mu\text{l}$  ずつ添加して、5%  $\text{CO}_2$ 、37°C、湿度100%にて48時間培養した。培養終了後、実施例2(3)A)の方法に従いTRAP染色を施し、検鏡に供した。

【0034】各種細胞の貪食能の解析は、FITCで蛍光標識された粒子経約  $0.75 \mu\text{m}$  のラテックスビーズ（ポリサイエンス社）を用いて解析した。15 ml の遠心チューブに10%の牛胎児血清を含む a-MEM培地で100倍に希釈したラテックスビーズ 1.5 ml と、細胞懸濁液 0.4 ml を混合して37°Cで振とうしながら1時間保温した。細胞を1000xgで遠心後、上清を廃棄して a-MEM培地で2回洗浄し、10%の牛胎児血清を含む a-MEM培地に懸濁した。さらに、実施例2(3)A)の方法により調製した48ウェルカルチャープレートに播種した後、 $1 \times 10^{-7}$  M の  $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  を  $4 \mu\text{l}$  ずつ添加して、5%  $\text{CO}_2$ 、37°C、湿度100%にて48時間培養した。培養終了後、実施例2(3)A)の方法に従いTRAP染色を施し、蛍光顕微鏡下で検鏡に供した。この結果、「MC-IOPs」は、48時間以内にTRAP陽性細胞に分化したが、その他の破骨細胞前駆細胞は、48時間以内に分化しなかった（図3）。

【0035】(5) 「MC-IOPs」のFACSによる解析  
A) 実施例1(2)の方法により調製した骨髓細胞と、実施例1(4)の方法により調製した「MC-IOPs」をPBSに懸濁した後、35  $\mu\text{m}$  のメッシュ付きチューブ（ファルコン社）に通し、1.5 ml のマイクロチューブ（トレフ社）に分注した。細胞懸濁液を2,500rpmで5分間遠心した後、約50  $\mu\text{l}$  を残して上清を吸引廃棄した。10倍希釈した抗Mac-2抗体（ベーリンガー社）を20  $\mu\text{l}$  添加した後、細胞をタッピングにより懸濁して氷上で30分間静置した。氷冷したPBSを1ml加え、3秒間ボルテックスミキサーにより懸濁した後、2,500rpmで5分間遠心した。約50  $\mu\text{l}$  を残して上清を吸引廃棄した後、100倍希釈したFITC標識された抗ラットIgG抗体（ジャクソン社、生化学工業）を20  $\mu\text{l}$  添加した後、細胞をタッピングにより懸濁して氷上で30分間静置した。氷冷したPBSを1ml加え、3秒間ボルテックスミキサーにより懸濁した後、2,500rpmで5分間遠心した。約50  $\mu\text{l}$  を残して上清を吸引廃棄した後、100倍希釈したビオチン標識された抗Ly-6G(Gr-1)抗体（ファーマンジェン社）を20  $\mu\text{l}$  添加して細胞を懸濁した後、氷上で30分間静置した。氷冷したPBSを1ml加え、3秒間ボルテックスミキサーにより懸濁した後、2,500rpmで5分間遠心した。約50  $\mu\text{l}$  を残して上清を吸引廃棄した後、10倍希釈したPE標識したストレプトアビジン（ベクター社、フナコシ）を20  $\mu\text{l}$  添加して細胞を懸濁した後、氷上で3

13

0分間静置した。氷冷したPBSを1ml加え、3秒間ボルテックスミキサーにより懸濁した後、2,500rpmで5分間遠心した。上清を吸引廃棄した後、PBS 1 ml に懸濁してFACScaliver (ベクトン-ディッキンソン社)を用いて2カラーで解析した(図4A)。

【0036】B) 実施例1(2)の方法により調製した骨髓細胞と、実施例1(4)の方法により調製した「MC-IOPs」をPBSに懸濁した後、35μmのメッシュ付きチューブに通し、1.5 ml のマイクロチューブに分注した。細胞懸濁液を2,500rpmで5分間遠心した後、約50μlを残して上清を吸引廃棄した。10倍希釈した抗F4/80抗体(セロテック社)、抗Mac-1抗体(セロテック社)、ビオチン標識された抗B220抗体(ファーマンジェン社)、ビオチン標識された抗CD3e抗体(ファーマンジェン社)をそれぞれ 20μl 添加した後、細胞をタッピングにより懸濁して氷上で 30分間静置した。氷冷したPBSを1ml加え、3秒間ボルテックスミキサーにより懸濁した後、2,500rpmで5分間遠心した。約50μlを残して上清を吸引廃棄した後、抗F4/80抗体と抗Mac-1抗体に対しては、100倍希釈したFITC標識された抗ラットIgG抗体を 20μl 添加し、また、ビオチン標識された抗B220抗体とビオチン標識された抗CD3e抗体に対しては、10倍希釈したPE標識したストレプトアビジンを 10μl 添加した後、細胞をタッピングにより懸濁して氷上で30分間静置した。氷冷したPBSを1ml加え、3秒間ボルテックスミキサーにより懸濁した後、2,500rpmで5分間遠心した。上清を吸引廃棄した後、PBS 1ml に懸濁して FACScaliverを用いて1カラーで解析した(図4B)。

【0037】以上、A) およびB)の結果、「MC-IOPs」は、抗Mac-2、Mac-1、Gr-1抗体陽性で、抗F4/80、B220、CD3e抗体陰性であった。

【0038】なお、Mac-2は破骨細胞およびマクロファージに発現しているマーカー、Mac-1は顆粒球、マクロファージに発現しているマーカー、Gr-1は顆粒球に発現しているマーカー、F4/80は成熟マクロファージに発現しているマーカー、B220はB細胞に発現しているマーカー、CD3eはT細胞に発現しているマーカーである。

【0039】[実施例3]

(1) OP/OPマウスの頭蓋骨細胞を用いた「MC-IOPs」の生成過程の解析

A) 実施例1(1)B)により調製したOP/OPの「MCs」を凍結融解し、25Tフラスコ(ファルコン社)に播種してサブコンフルエントになるまで培養した。細胞をトリプシン-EDTAにより回収した後、OP/OPの「MCs」 $1 \times 10^6$  cells と、実施例1(2)で調製した脛骨2本分の「BMs」を10%の牛胎児血清を含む a-MEM培地 20mlに懸濁させ、10 cm のカルチャーディッシュに播種した後、10μg/ml rhCSF-1を200μl 添加して、5% CO<sub>2</sub>、37℃、湿度100%にて培養した。培養後2日目と5日目に培地を全量廃棄し、10 ng/ml の rhCSF-1及び 10%の牛胎児血清を含む a-MEM

14

培地20mlを加えて7日間培養した。さらに、実施例1

(4)の方法により細胞を調製し、実施例2(5)A)の方法に従い抗Mac-2抗体と抗Gr-1抗体を用いて2重染色し、FACScaliver により解析した。

【0040】B) A) ので調製した細胞を用いて、実施例2(3)A) 同様の方法でアッセイを行った。

【0041】以上の結果、op/op マウスの「MCs」によって支持された造血細胞は抗Mac-2抗体陰性であったが、CSF-1存在下で抗Mac-2抗体陽性の細胞に分化した(図5A)。

【0042】また、破骨細胞への分化誘導アッセイにおいてop/opマウスの「MCs」と共存培養して得られた細胞はTRAP陽性細胞に分化できなかったが、CSF-1(100ng/ml)存在下でop/opマウスの「MCs」と共存培養した細胞は、TRAP陽性細胞に分化した(図5B)。なお、図中の白抜きの棒グラフは、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の代わりにベヒクルを用いた対照である。

【0043】(2) ストローマ細胞株を用いた「MC-IOPs」の生成過程の解析

20 実施例1(4)の方法に従い調製した「MC-IOPs」と、「MCs」の代わりにST2細胞株とOP9細胞株を用いて実施例1(4)の方法により細胞を調製し、実施例2(5)A)の方法に従い抗Mac-2抗体と抗Gr-1抗体を用いて2重染色し、FACScaliverにより解析した。この結果、ST2細胞株とOP9細胞株を用いた場合には、Mac-2陽性とGr-1陽性の「MC-IOPs」は形成されなかった(図6)。また、ST2細胞株とOP9細胞株を用いて生成した細胞を用いて 実施例2(3)A) 同様の方法でアッセイを行ったが、いずれの48時間までにTRAP陽性細胞へは分化しなかった。なお、図中のAは、ST2細胞株を用いたもの、BはOP9細胞株を用いたもの、CはOP9細胞株を用いM-CSFを100ng/ml添加したものである。

【0044】[実施例4]

(1) 「MC-IOPs」の分化に必要な「MCs」の骨吸収因子( $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、副甲状腺ホルモン、プロスタグランジンE<sub>2</sub>)による処理条件と細胞の形状の解析「MCs」を $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  で前処理する場合には、実施例2(3)A)の方法で「MCs」を 48ウェルカルチャープレートに用意し、10%の牛胎児血清を含む a-MEM培地を400 μl 及び $10^{-6}$  M の  $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  を4μl 添加して、2日間培養した後、a-MEM培地で 2回洗浄した。さらに、「MCs」と「MC-IOPs」を接触させてアッセイを行う場合には、実施例1(4)の方法に従い調製した「MC-IOPs」 $2 \times 10^3$  cells を400μl の 10%の牛胎児血清を含む a-MEM培地に懸濁して播種し、5% CO<sub>2</sub>、37℃、湿度100%で2 時間培養した。培地を廃棄した後、10%牛胎児血清を含む0.08 % コラーゲンゲル(新田ゼラチン社)200μl をゆっくりと重層した後、10%の牛胎児血清を含む a-MEM培地200μl を添加して、5% CO<sub>2</sub>、37℃、湿度100%にて48 時間培養した。「MCs」と「MC-IOPs」の接触を阻止す



15

る場合には、「MCs」の単層に10%牛胎児血清を含む0.08% コラーゲンゲル200 $\mu$ l をゆっくりと重層し、実施例1(4)の方法に従い調製した「MC-IOPs」 $2 \times 10^3$  cellsを200 $\mu$ lの10%の牛胎児血清を含むa-MEM培地に懸濁して播種し、5% CO<sub>2</sub>、37°C、湿度100%にて48時間培養した。

【0045】「MCs」を $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ で後処理する場合には、実施例2(3)Aの方法で「MCs」を48ウェルカルチャープレートに用意し、10%の牛胎児血清を含むa-MEM培地を添加して2日間培養し、「MCs」をa-MEM培地で2回洗浄した。さらに、「MCs」と「MC-IOPs」を接触させてアッセイを行う場合には、実施例1(4)の方法に従い調製した「MC-IOPs」 $2 \times 10^3$  cellsを400 $\mu$ lの10%の牛胎児血清を含むa-MEM培地に懸濁して播種し、5% CO<sub>2</sub>、37°C、湿度100%にて2時間培養した。培地を廃棄した後、10%牛胎児血清を含む0.08% コラーゲンゲル200 $\mu$ lをゆっくりと重層した後、10%の牛胎児血清を含むa-MEM培地200 $\mu$ lを添加し、さらに $10^{-6}$ Mの $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を4 $\mu$ l添加して、5% CO<sub>2</sub>、37°C、湿度100%で48時間培養した。「MCs」と「MC-IOPs」の接触を阻止する場合には、「MCs」の単層に10%牛胎児血清を含む0.1% コラーゲンゲル200 $\mu$ lをゆっくりと重層し、実施例1(4)の方法に従い調製した「MC-IOPs」 $2 \times 10^3$  cellsを200 $\mu$ lの10%の牛胎児血清を含むa-MEM培地に懸濁して播種し、さらに $10^{-6}$ Mの $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を4 $\mu$ l添加して、5% CO<sub>2</sub>、37°C、湿度100%で48時間培養した。培養終了後、実施例2(3)Aの方法に従いTRAP染色を施した後検鏡に供した。この結果、

「MC-IOPs」は、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ で前処理した「MCs」上でも接触を介してTRAP陽性細胞に分化した(図7)。

【0046】(2)「MC-IOPs」の分化に必要な「MCs」の形状の解析

実施例4(1)Aの方法に従い「MCs」を $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ と副甲状腺ホルモンにより前処理した後、「MCs」をa-MEM培地で2回洗浄した。a-MEM培地400 $\mu$ lを添加した後、-80°Cのディープフリーザーで完全に凍結した。さ \*

16

\*らに、37°Cのインキュベーター内で融解した。同様の操作をさらに1回繰り返した後、a-MEM培地を廃棄して、a-MEM培地で1回リンスした。さらに、10%の牛胎児血清を含むa-MEM培地を添加して、5% CO<sub>2</sub>、37°C、湿度100%で48時間培養した。培養終了後、実施例2(3)Aの方法に従いTRAP染色を施した後検鏡に供した。

【0047】また、カルシトニン受容体を確認するために、24ウェルカルチャープレートに静置したセルディスク(住友ベークライト社)上で実施例4(1)Bの方法に従い実験を行った後、a-MEM培地で1回洗浄し、0.2 nMの<sup>125</sup>I標識したヒトカルシトニンを200 $\mu$ l添加して室温で1時間静置した。氷冷したa-MEM培地で5回洗浄した後、2%ホルマリン/2%グルタルアルデヒド溶液(0.1Mのカコジレート緩衝液(0.2M cacodylate 50 ml(和光純薬社)、0.1M HCl 4.15 mlを蒸留水を用いて100 mlに調製した)で希釈して10分間固定し、カコジレート緩衝液で2回洗浄した後、実施例2(3)に従いTRAP染色を施した。風乾後、セルディスクをユーキッドを用いてスライドガラスに固定し、乳剤(アマシャム社)で包埋して4°Cで2週間露光させた。現像後、検鏡に供した。 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ で前処理した「MCs」の結果を図8に示す。Aはコントロール「MCs」(phase contrast)、Bはコントロール「MCs」(light field)、Cは凍結融解により細胞膜を固定した「MCs」(phase contrast)、Dは凍結融解により細胞膜を固定した「MCs」(light field)である。この結果、凍結融解した細胞膜上でも「MC-IOPs」はカルシトニン受容体陽性の前破骨細胞へ分化した。

【0048】また、骨吸収因子として $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、副甲状腺ホルモン、プロスタグランジンE<sub>2</sub>を用いてTRAP染色を行った結果、プロスタグランジンE<sub>2</sub>を用いた場合には、凍結融解した細胞膜上ではTRAP陽性細胞へ分化しなかった(表2)。

【0049】

【表2】

前処理(48時間)	TRAP陽性細胞数/ウェル	
	対照	凍結融解
ベヒクル	0	0
$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3(1 \times 10^{-8} \text{M})$	290.6 $\pm$ 39.2	100.3 $\pm$ 20.9
副甲状腺ホルモン( $1 \times 10^{-8} \text{M}$ )	246.6 $\pm$ 67.7	53.3 $\pm$ 9.2
プロスタグランジンE <sub>2</sub> ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ )	150.3 $\pm$ 37.6	0

(3) OP/OPマウスの頭蓋骨細胞を用いた「MC-IOPs」の分化過程の解析

実施例1(1)Bにより調製したOP/OPマウスと+/?

(ヘテロ体)マウスの「MCs」を凍結融解し、25Tフラスコ※50

※コに播種してサブコンフルエントになるまで培養した。

細胞をトリプシン-EDTAにより回収した後、実施例2

(3)Aの方法に従い48ウェルプレートに細胞を調製した。実施例1(4)の方法に従い調製した「MC-IOPs」

17

2x10<sup>5</sup> cells を 10%の牛胎児血清を含む a-MEM培地 400  $\mu$ l に懸濁して播種し、10  $\mu$ g/ml のrhCSF-14  $\mu$ l を OP/OPマウスの「MCs」に添加して、5% CO<sub>2</sub>、37°C、湿度100%にて 48時間培養した。培養終了後、実施例2(3)A)の方法に従いTRAP染色を施した後検鏡に供した。この結果、op/opマウスの「MCs」上では、1  $\alpha$ , 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 存在下においてもTRAP陽性細胞に分化せず、CSF-1を添加したときのみ1  $\alpha$ , 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 存在下でTRAP陽性細胞に分化した(図9)。なお、図中の白抜きの棒グラフは、1  $\alpha$ , 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の代わりにベヒクルを用いた対照である。

#### 【0050】

【発明の効果】本発明により骨細胞への分化過程において生ずる破骨細胞前駆細胞が提供された。本発明の破骨細胞への分化系を用いれば、破骨細胞系細胞の分化を決定する因子を検出し、単離することが可能であり、また、単離される分化促進因子またはその遺伝子は、例えば、骨粗鬆症などの骨量減少症の改善、リウマチや変形性関節症などの骨代謝異常症などの改善、大理石病などの骨量増加症の改善、多発性骨髄腫や癌の骨転移などの骨代謝異常疾患の治療および改善などに用いられることが考えられ、さらにこれらの疾患の免疫学的診断を確立するための抗原の探索への利用も考えられる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】第1図は、「BMs」と「MCs」の共存培養における、造血系細胞の分化による経時的な形態変化をライト

18

-ギムザ染色により示す。

【図2】第2図Aは、「MC-IOPs」と「BMs」の「MCs」上での破骨細胞への分化過程を経時的に解析した結果を示す。第2図Bは、はん種した「MC-IOPs」と「BMs」の細胞数とTRAP陽性細胞へ分化した細胞数との相関を示す。

【図3】第3図は、「MC-IOPs」と各種破骨細胞前駆細胞との分化段階を比較した結果を示す。

【図4】第4図は、「MC-IOPs」の形状を表面抗原に対する抗体を用いてFACScaliberで解析した結果を示す。

【図5】第5図は、「MC-IOPs」の生成における「MCs」の産生するCSF-1の役割を、op/opマウスの「MCs」と骨髓細胞との共存培養を用いて解析した結果を示す。

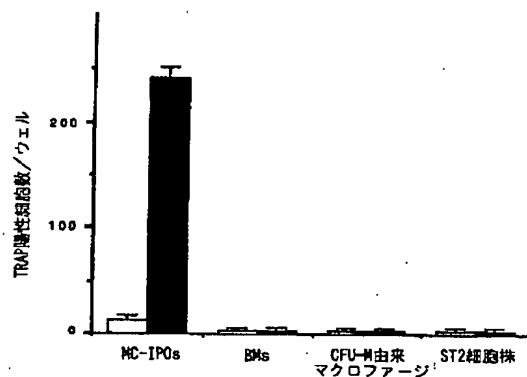
【図6】第6図は、ストローマ細胞株を用いた「MC-IOPs」の生成の解析を示す。

【図7】第7図は、「MC-IOPs」の分化に必要な、1  $\alpha$ , 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> の処理条件とそれによる「MCs」の形状を検討した結果を示す。

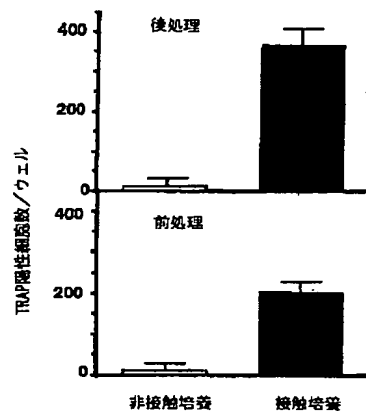
【図8】第8図は、1  $\alpha$ , 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> で前処理した後、凍結融解した「MCs」上でTRAP陽性細胞に分化した「MC-IOPs」のカルシトニン受容体を<sup>125</sup>I標識したヒトカルシトニンの結合により検出した像を示す。

【図9】第9図は、「MC-IOPs」の分化に必要な「MCs」の形質を、op/opマウスの「MCs」を用いて検討した結果を示す。

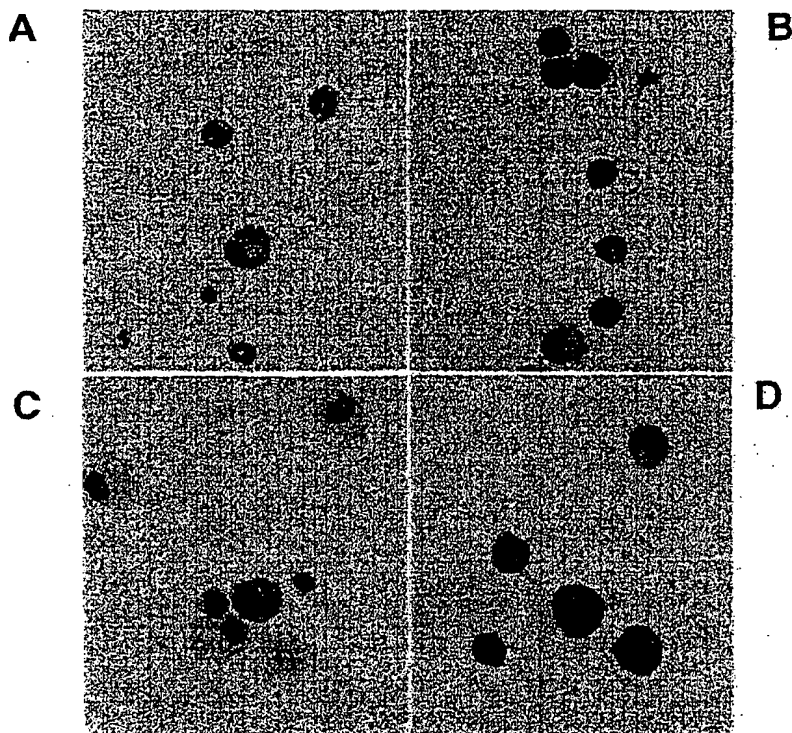
【図3】



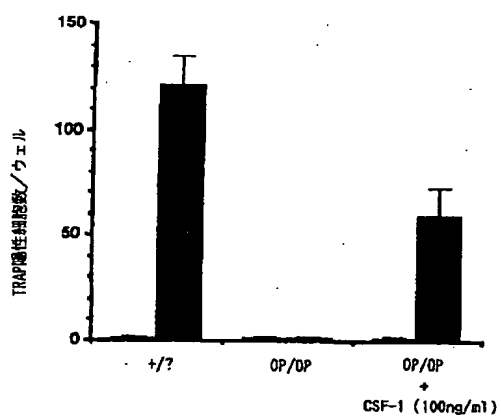
【図7】



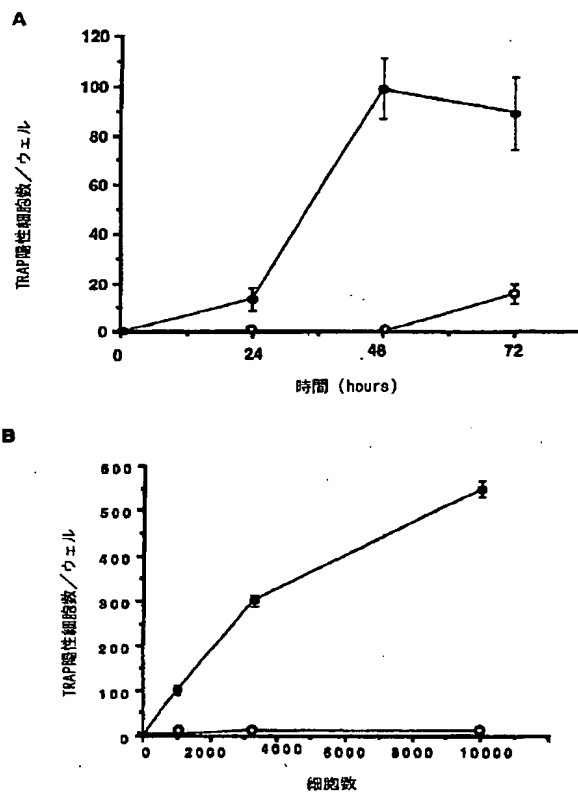
【 図 1 】



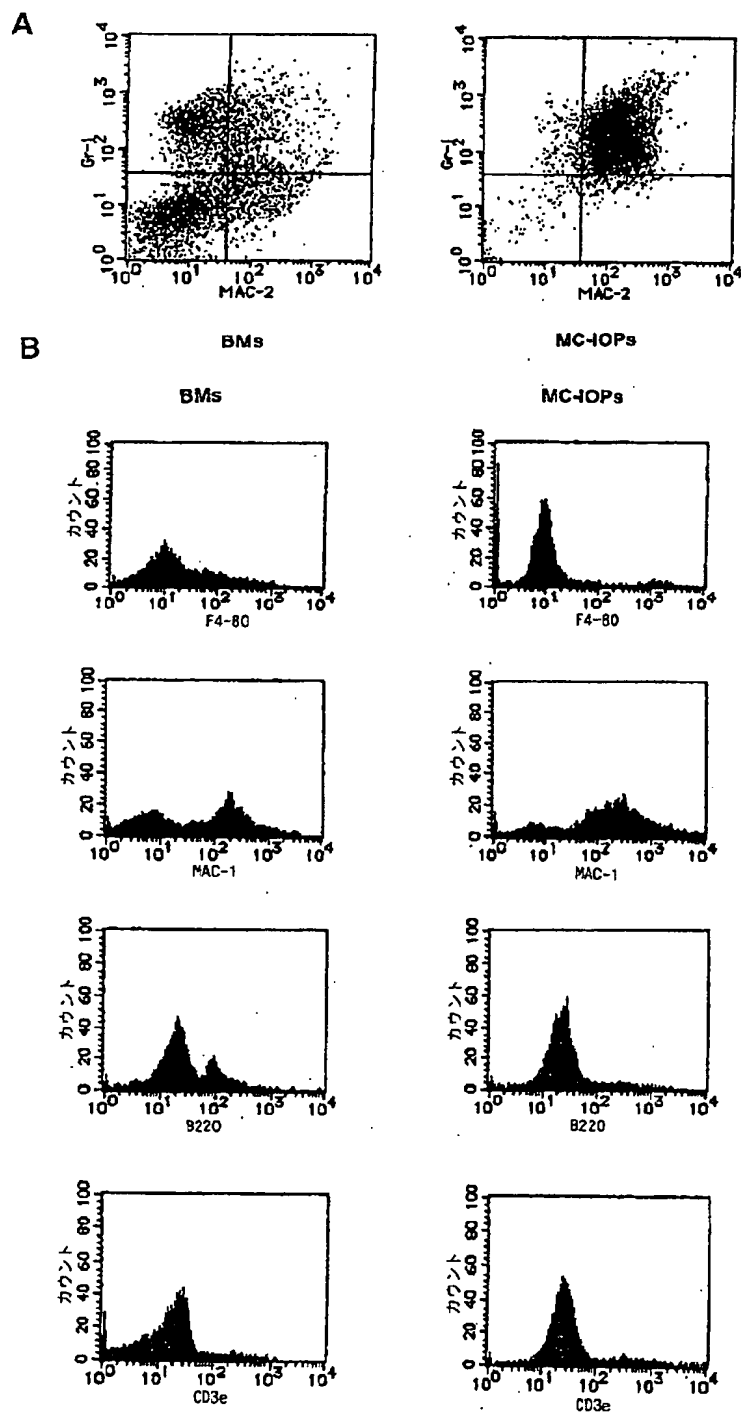
【 図 9 】



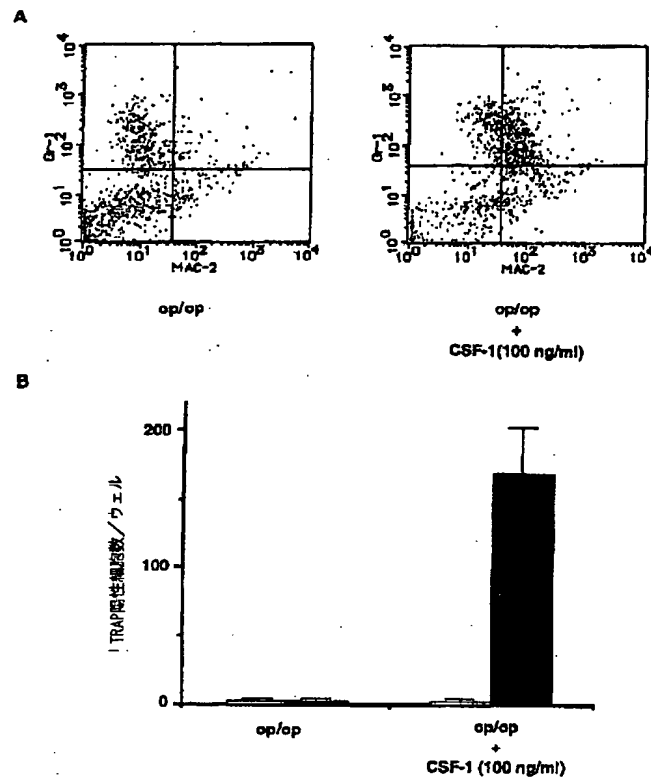
【図2】



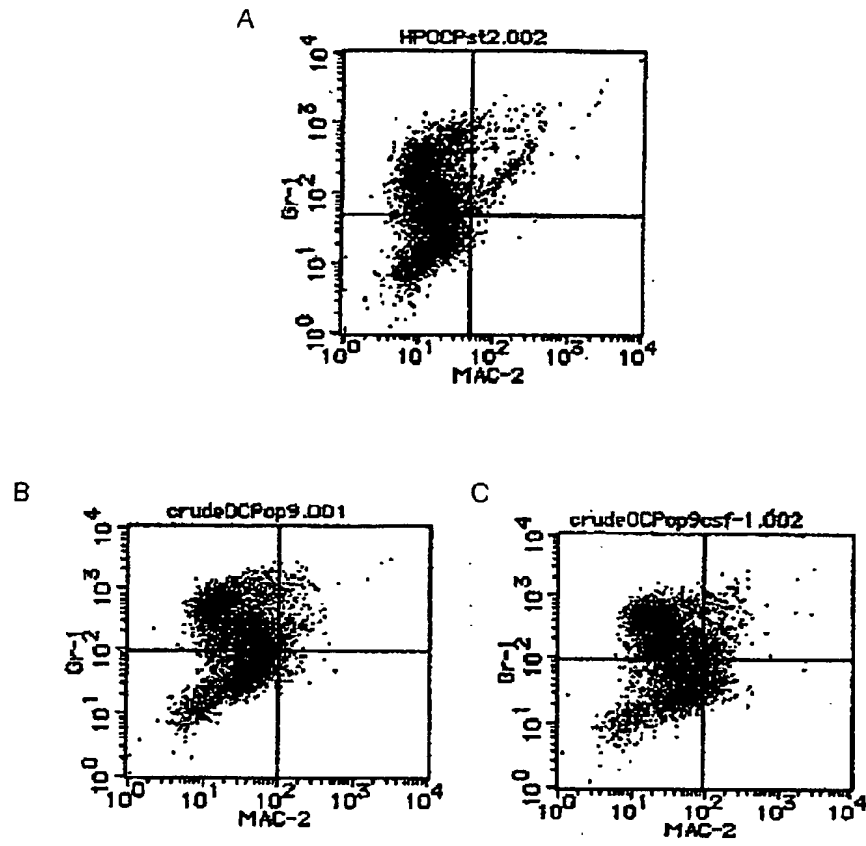
【図4】



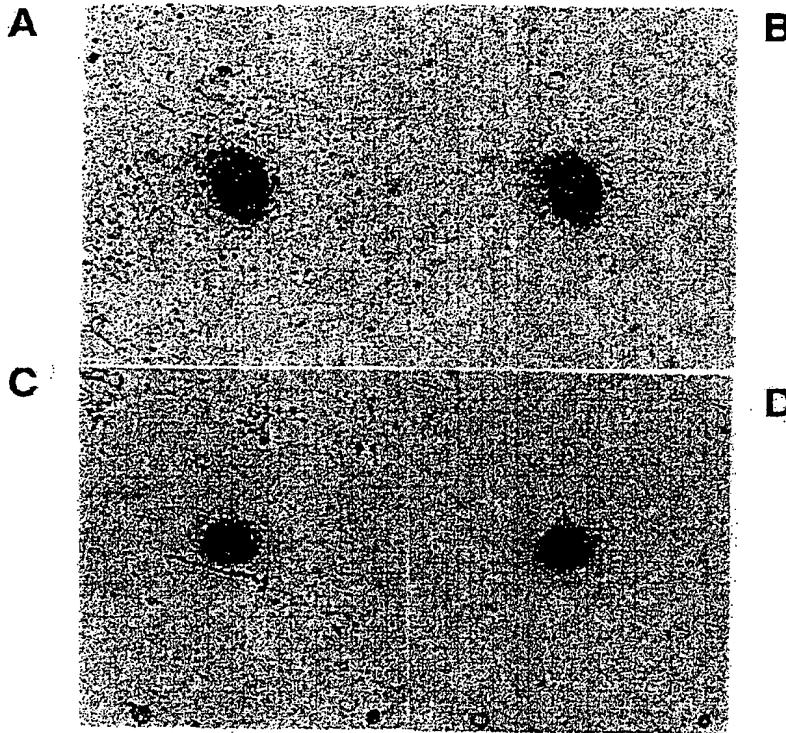
【図5】



【図6】



【図8】




---

フロントページの続き

(72)発明者 肥山 良之  
 京都府京都市山科区四ノ宮南河原町14 科  
 研製薬株式会社総合研究所内

(72)発明者 須田 立雄  
 東京都品川区旗の台1-5-8 昭和大学  
 歯学部生化学教室内

(72)発明者 高橋 直之  
 東京都品川区旗の台1-5-8 昭和大学  
 歯学部生化学教室内

(72)発明者 仲村 一郎  
 東京都品川区旗の台1-5-8 昭和大学  
 歯学部生化学教室内

(72)発明者 自見 英治郎  
 東京都品川区旗の台1-5-8 昭和大学  
 歯学部生化学教室内

(72)発明者 宇田川 信之  
 東京都品川区旗の台1-5-8 昭和大学  
 歯学部生化学教室内